

VU Research Portal

Leven aan de grenzen van leven

Ernst, W.H.O.

2002

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Ernst, W. H. O. (2002). *Leven aan de grenzen van leven*. VU Boekhandel/Uitgeverij.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

00054

ZB

Prof.dr. W.H.O. Ernst

Leven aan de grenzen van leven

vrije Universiteit



Prof.dr. W.H.O. Ernst

Leven aan de grenzen van leven

Afscheidsrede uitgesproken bij het aftreden als hoogleraar plantkunde bij de Faculteit der Aard- en Levenswetenschappen van de Vrije Universiteit te Amsterdam op 18 april 2002

vrije Universiteit

amsterdam





Mijnheer de rector magnificus,

Dames en Heren,

Hartelijk welkom bij mijn laatste college dat ik geef als afsluiting van mijn onderwijs voor studenten in de biologie, medische biologie, milieuwetenschappen en fysieke geografie.

Prior to continue my lecture I will welcome my non-Dutch speaking guests and staff members from many European countries and other continents. Due to the university tradition I will speak Dutch, but I hope that you can follow my lecture by looking at the slides, tables and figures; their headings are given in English. Further I also have to mention that the pronunciation of scientific names of organisms will follow the continental European tradition. I apologize for this inconvenience.

Inleiding

In dit college wil ik het niet hebben over de levensduur van het individu. Van de diverse aspecten van het leven is de levensduur zeker een interessant onderwerp omdat er nog weinig verklaringen zijn voor de grote variatie in leeftijdsverwachting, van 20 minuten bij een bacterie tot 4000 jaar bij sommige naaldbomen. In dit college wil ik wel de aandacht vragen voor factoren die aan de mogelijkheden van plantenleven grenzen stellen, juist omdat planten aan het begin van de voedselketen staan en zonder planten geen hogere dierlijke levensvormen op aarde mogelijk zijn. Het is fascinerend het overleven van organismen aan deze grenzen van het leven niet alleen te observeren, maar vooral de achterliggende causale processen op te sporen die het sommige planten mogelijk maken om op plekken te leven waar alle andere organismen geen kans meer hebben. Conform mijn leeropdracht "Plantkunde" hoop ik u in dit afscheidscollege aan de hand van enkele voorbeelden te laten zien hoe onderzoek naar het leven aan deze grenzen van het leven inzicht kan verschaffen in de maximale mogelijkheden van fysiologische aanpassingen om een populatie van een soort, van generatie op generatie te laten voortbestaan. De grootte van plaatsen met extreme condities voor het leven op aarde kan zich uitstrekken over honderden km², maar ook kleiner zijn dan 1 m² of 1 cm².

Extreme habitats op aarde als grenzen van leven

Om u in de gelegenheid te stellen mijn verhaal in de juiste context te plaatsen wil ik u eerst laten kennismaken met enkele van deze grenzen van het leven. Sinds het begin van de evolutie hebben organismen gepoogd vele, of misschien wel alle plekken op aarde te koloniseren. Toch is het leven er niet in geslaagd in een periode van miljoenen jaren alle extreme habitats te veroveren. Extreme milieucondities ontstaan zonder invloed van de mens op ruimtelijk beperkte schaal of in tijdelijk begrensde perioden door fysieke en/of chemische condities.

Fysieke grenzen

Fysische grenzen van leven ontstaan door extreme temperaturen, grote mobiliteit van het substraat en tekorten aan water. Zij zijn er verantwoordelijk voor dat slechts heel weinig organismen in staat zijn in woestijnen te leven.

Bij permanente lage temperaturen onder het vriespunt speelt het vrije water een beslissende rol. Bevriezing van het vrije water laat de hydratatie van moleculen in een cel niet meer toe; bovendien kunnen ijskristallen de biomembranen mechanisch beschadigen zodat ieder leven onmogelijk wordt. Toch zijn organismen ontstaan die de optimum temperatuur van hun leven dicht bij het vriespunt van het water hebben. Bij een opletten wandeling in de zomer over sneeuw- en gletsjervelden kan men rood gekleurde oppervlakten waarnemen. Deze kleur is een indicatie voor de aanwezigheid van grote aantallen van de ééncellige alg *Chlamydomonas nivalis*. Deze algen kunnen zoals vele planten in het hooggebergte op grond van vele vorstbeschermende maatregelen het vrije water in de cel zodanig laag houden dat fotosynthese nog bij -6 °C mogelijk is. Naast de aanpassing aan lage temperaturen moeten deze algen ook nog voorzieningen treffen om zich tegen een hoge dosis ultraviolet licht te beschermen. Deze bescherming realiseren deze algen en vele andere plantensoorten met de synthese van kleurstoffen (Rozema et al. 1997, Duval et al. 1999).

Ook in milieus met extreem hoge temperaturen, zoals bijv. in het Yellowstone National Park, speelt de vermindering van het vrije water in de cel een belangrijke rol. Alleen de extreem thermofiele oerbacteriën, de Archaea, hebben in de loop van de evolutie hun stofwisseling zodanig aangepast aan hoge temperaturen dat het optimum tussen 75 en 90 °C ligt, wat betekent dat de eiwitten van alle andere organismen bij die temperaturen reeds zijn gestold (Cacciapuoti et al. 2001). Deze bijzondere eigenschap wordt gerealiseerd door vermindering van waterminnende bestanddelen in de biomembranen en in de eiwitten van de cel (Sterner & Liebl 2001).

Een ander obstakel voor het leven is de structuur van het substraat die de beschikbaarheid van nutriënten en water moeilijk maakt. De compacte structuur van rotsblokken wordt slechts door enkele korstmossen doorbroken. Door de uitscheiding van organische zuren lost het gesteente op en ontstaan kleine spleten in een compacte rots, die na verdere verwerking tot kleine uithollingen uitgroeien. Na een tropische regenbui vullen deze minipoeltjes zich tijdelijk met water. Na maandenlange uitdroging komen volledig verdroogde planten ineens weer tot leven zoals *Craterostigma monroi*. Deze zogenaamde “verrijzenisplanten” (resurrection plants) kunnen dan binnen een dag groen worden, groeien en bloeien. Mijn opvolger, mevr. Prof. dr. Dorothea Bartels heeft deze verrijzenisplanten gekozen als modelorganisme voor het onderzoek naar de genetische basis en fysiologische sturing van langdurige uitdroging van planten (Ramanjulu & Bartels 2002).

Chemische levensgrenzen

Beschikbaar water en adequate temperaturen zijn slechts twee condities voor het leven. Iedere cel en ieder organisme heeft een behoefte aan anorganische elementen om leven mogelijk te maken. Van de honderd chemische basiselementen hebben planten slechts 16 en de mens nog eens 4 (F, J, Se, Co) extra nodig voor het goed laten verlopen van alle stofwisselingsprocessen. Zodra een bepaalde concentratie van een chemisch element - onafhankelijk van zijn functie in de stofwisseling - een

tekort vertoont of overschreden wordt, zijn specifieke aanpassingen nodig om zich in habitats met extreme chemische condities te kunnen handhaven.

Hoge concentraties van zout aan de kusten van oceanen en binnenlandse zoutbronnen hebben heel specifieke zoutresistente plantengemeenschappen met heel weinig soorten laten ontstaan. Toch laten de open, onbegroeide plekken op zoutige bodems zien, dat aan de evolutie van zoutresistentie grenzen gesteld zijn. Op zulke plaatsen worden zoutconcentraties bereikt die de cellulaire processen, zelfs door hoog zoutresistente plantensoorten niet meer fatsoenlijk kunnen laten regelen. De verzilting van bodems door een ondoelmatige irrigatie door de mens neemt nog steeds wereldwijd toe, met name in semi-aride gebieden. Men is er nog ver van verwijderd om de moleculair-biologische processen van zoutresistentie te begrijpen (Yeo 1998), en daarmee tot oplossingen voor tuin-, land- en bosbouw in verzilte gebieden te komen.

Hoge concentraties van zware metalen in de buurt van ertsaderen hebben op alle continenten tot een ontwikkeling van metaalresistente planten en vegetaties geleid (Ernst 1974). In Europa worden zulke vegetaties gedomineerd door metaal-resistente kruiden zoals Blaassilene (*Silene vulgaris*), Voorjaarskers (*Minuartia verna*), Zinkboerenkers (*Thlapsi caerulescens*), Engels gras soorten (*Armeria muelleri*, *A. halleri*, *A. calaminaria*) en grassen zoals Rood struisgras (*Agrostis capillaris*) en Schapegras (*Festuca ovina*).

Bij het smelten van ertsen zijn reeds vanaf de Bronstijd zware metalen in het milieu geëmitteerd. Deze metaalcontaminatie heeft met de verdere industrialisatie zulke vormen aangenomen dat in voorheen schone gebieden nieuwe grenzen voor het leven opgeworpen zijn. Soms kunnen op honderden hectare land in de omgeving van metaalverwerkende industrieën alleen nog hoog metaalresistente planten groeien, zoals in de omgeving van Budel (Dueck et al. 1986), of de metaal vervuilde bodems blijven nagenoeg onbegroeid, zoals in de buurt van Legnica in Polen (Brej 1998) and Sudbury in Canada (Gunn et al. 1995). Zware metalen kunnen door organismen niet worden afgebroken. Met zware metalen verrijkte lagen in sedimenten van rivieren en meren, in hoogvenen en in de ijskappen van Arctica zijn als geochemisch archief van menselijk handelen over duizenden jaren geconserveerd gebleven en geven een indruk van de omvang van de atmosferische milieuvervuiling in het verleden (Lee & Tallis, 1973, Ernst et al. 1974, Van Geel et al. 1989, Hong et al. 1996).

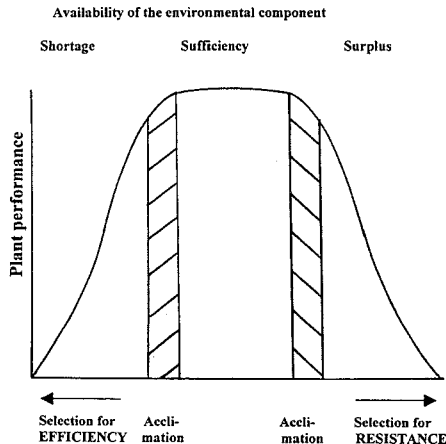
Met zware metalen vervuuld rivierslib, afkomstig uit mijnbouwgebieden, kan over grote afstanden langs de oevers van rivieren afgezet worden (Ernst 1974), zoals in het Geuldal in Zuid Limburg (Swennen et al. 1994). In deze vallei was de vervuiling met zware metalen door de Belgische zink- en lood- mijnbouw zo groot dat zich zelfs een metaalresistente vegetatie met Zinkviooltje (*Viola lutea* ssp. *calaminaria*) en Zinkboerenkers op de Geuloevers in Nederland kon ontwikkelen. Door de bescherming van het metaalvervuilde gedeelte van het Nederlandse Geuldal en het aanwijzen van het Zinkviooltje als beschermde plant, heeft Nederland de wereldprimeur een gebied onder natuurbescherming gesteld te hebben, dat zijn vegetatie te danken heeft aan grote industriële milieuvervuiling. De vermindering van de metaalbelasting van het Geulslib door Belgische milieumaatregelen over de laatste twee decaden zou in Nederland tot grote vreugde aanleiding moeten geven (Verkleij & Ernst 1991). Helaas is de rationaliteit zoek: nu klinkt de klaagzang over het verdwijnen van het Zinkviooltje als een zeer zeldzame, sterk achteruitgaande

soort van de Rode Lijst (Van der Meijden et al. 2000). Natuurbeschermers en de wetgever hebben nog steeds niet begrepen dat het Zinkvioletje in Nederland vergelijkbaar is met een allochtoon met een tijdelijke verblijfsvergunning.

Samenvattend kan voor alle extreme habitats het volgende gesteld worden: De biodiversiteit aan de grenzen van het leven is zeer laag, maar de zeldzaamheid van de aanwezige organismen is daarentegen zeer hoog. Alle organismen die in extreme habitats leven hebben blijkbaar zeer specifieke aanpassingen nodig die het mogelijk maken met een overmaat of een tekort van levenbegrenzende condities en factoren terecht te komen.

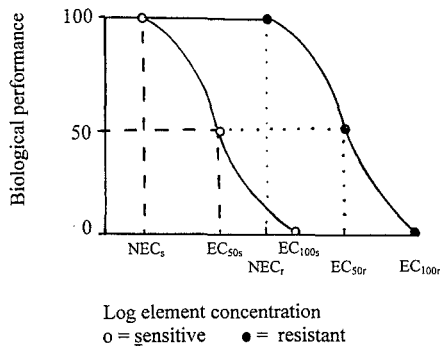
Mogelijkheden en snelheid van de evolutie van resistenties tegen zware metalen

Planten van extreme milieus zijn veelal aan tegenovergestelde selectie processen onderworpen. Zij moeten een oplossing vinden voor het beheersen van een overmaat, d.w.z. een selectie voor resistentie, en tegelijkertijd moeten zij met tekorten van de groeiplaats uitkomen, d.w.z. een selectie voor efficiëntie (afb. 1).



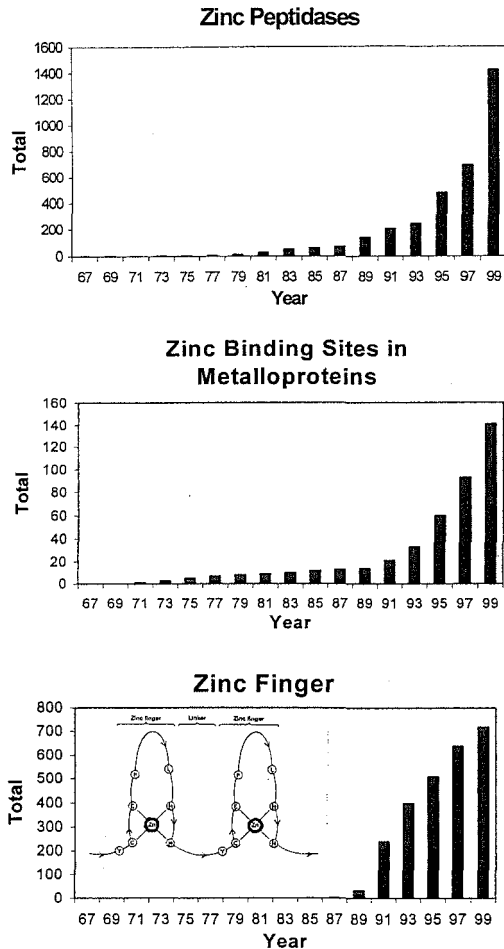
Afbeelding 1. De mogelijkheden voor de evolutie van planten om een overmaat en/of een tekort van milieucomponenten te overleven. Het gestreepte gebied is de zone van fenotypische acclimatie (gemodificeerd naar Ernst 1996).

De basis van alle resistenties is gelegen in een verschuiving van de grenzen van optimale biologische prestaties naar hogere concentratie gebieden, die veelal een factor 10 tot 100 boven de getolereerde concentratie van niet-resistente planten liggen (afb. 2). Daarmee wordt duidelijk dat ook een bovengrens van de resistentie bestaat (Ernst et al. 2000).



Afbeelding 2. Selectie voor metaal resistentie verschuift het "physiological optimum" (NEC = geen effect concentratie) en de toxiciteitsgrens (EC_{100}) van resistente planten (r) ten opzichte van sensitieve planten (s) naar hogere concentraties. EC_{50} is de concentratie waarbij de prestatie van de planten met 50% verminderd is. De EC_{50} concentratie speelt een belangrijke rol bij de beoordeling van milieutoxiciteit.

Hoe is het met de potentie voor zulke aanpassingen bij hogere planten gesteld? Hiervoor heb ik het voorbeeld van de evolutie van resistentiemechanismen tegen een overmaat aan zware metalen in het milieu gekozen. Deze keuze is niet alleen ingegeven door mijn 40 jaar geleden begonnen onderzoek over de ecologie van zware metaalvegetaties en de ecofysiologie van metaalresistente planten (Ernst 1965, 1968). Vijftig jaar geleden waren er wereldwijd slechts twee onderzoeksgroepen geïnteresseerd in de evolutie (Bradshaw 1952) en de fysiologische opheldering van resistentiemechanismen tegen zware metalen (Baumeister 1954), beide groepen onafhankelijk met het concept van de vergelijking van ecotypen van één soort.

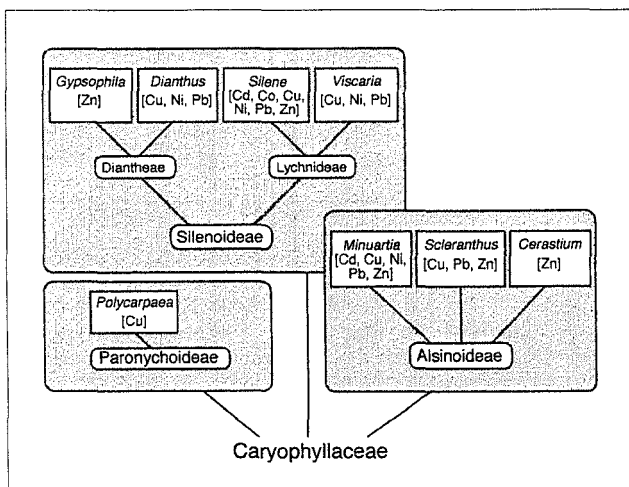


Afbeelding 3. De ontdekking van zink peptidases en de bepaling van zinkbinding in metalloproteïnen van 1954 t/m 1999 (compilatie van Auld 2001) en het aantal publicaties over zinkvingers sinds de eerste ontdekking in 1985 tot en met 2001 (compilatie van Ernst 2002).

Later volgde ecologisch-taxonisch onderzoek van zware metaalresistente planten in de (sub)tropen van Zaïre (Duvigaud 1959) en Zimbabwe (Wild 1968). Deze lage biologische interesse in zware metalen van 20 tot 40 jaar geleden is gedurende de laatste decade wereldwijd omgeslagen in een zeer grote belangstelling voor fundamenteel onderzoek naar metaal gestuurde processen in enzymen (Vallee & Auld 1990) en cellen (afb. 3), m.n. naar de rol van zink in de zink-vinger bij het overschrijven van genetische informatie (Rhodes & Klug 1993), en het toegepast onderzoek naar de zuivering van met zware metalen gecontamineerde bodems met behulp van planten (fytoremediatie) die grote hoeveelheden metaal uit de grond

kunnen opnemen, zoals de Zinkboerenkers (Salt et al. 1998, Chaney et al. 2000, Mench et al. 2000).

Na deze algemene opmerkingen vooraf, wil ik mij nu richten op de evolutie van metaalresistentie. In het hele rijk van de bloemplanten heeft slechts een beperkte hoeveelheid plantensoorten sedert hun eerste verschijnen in het krijtijdperk, ca. 140 miljoen jaar geleden, bodems met een hoog metaalgehalte kunnen begroeien (Ernst 1996). Binnen plantensoorten die tot een familie behoren, zijn niet alle leden in staat metaalresistentie te ontwikkelen, en zelfs binnen een geslacht kunnen niet alle soorten tegen alle zware metalen resistent worden, zoals een beschouwing van de familie van de Anjergewassen (Caryophyllaceae) laat zien (afb. 4; Ernst 2001). Alleen de Blaassilene (*Silene vulgaris*) is een soort die zich heeft kunnen aanpassen aan een overmaat van vele zware metalen in de bodem. Omdat zij ook gekenmerkt is door een hoge fysiologische flexibiliteit en een hoog genetisch potentiaal is deze soort ook door mij als modelsoort gekozen.



Afbeelding 4. De verschillende potenties tot evolutie van resistentie tegen een of meerdere metalen in de Anjerfamilie (Caryophyllaceae), gemodificeerd naar Ernst (2001).

De contaminatie van bodems met zware metalen door menselijk handelen biedt een unieke gelegenheid de snelheid van de evolutie te bestuderen, een mogelijkheid die alleen nog door de evolutie van pesticidenresistentie geëvenaard is (Bishop & Cook 1981). Bradshaw (1952) is 50 jaar geleden begonnen het onderzoek naar deze evolutionaire processen te stimuleren. Daarom ben ik erg vereerd dat Professor Anthony Bradshaw als nestor van de evolutionaire benadering van resistentie tegen zware metalen hier aanwezig is en bijgedragen heeft aan het fantastische symposium

"From plant community to molecule". Door onderzoek in metaal-gecontamineerde gebieden kon aangetoond worden dat het selectieproces zeer snel verloopt en dat genetische veranderingen in de overlevende plantenpopulaties al in minder dan 10 jaar meetbaar zijn. De eerste genetische aanpassing van een populatie van Fioringras (*Agrostis stolonifera*) kon worden vastgesteld in de buurt van een koperraffinaderij na blootstelling van slechts vier jaar (Wu & Bradshaw 1972). Met vergelijkbare snelheid verliep de selectie van zink-resistentie in Gewoon struisgras (*Agrostis capillaris*) in de buurt van een zgn. moderne Zn/Cd-smelterij in het Roergebied, waar na blootstelling aan hoge zinkemissie reeds na vijf jaar deze planten volledig resistent waren (Ernst 1976). De evolutiesnelheid lijkt minder hoog te zijn voor plantensoorten, die op natuurlijk met metalen verrijkte bodems voorkomen; hoewel de begroeiing van zulke natuurlijke habitats over veel langere perioden heeft plaats gevonden (sedert de laatste ijstijd in Midden- en Noord-Europa en over nog langere perioden in de (sub)tropen) heeft dat uiteindelijk geresulteerd in veel hoog aangepaste, veelal endemische plantensoorten.

Algemeen kan geconcludeerd worden dat de mogelijkheid van plantensoorten voor de evolutie van resistentie met toenemende metaalconcentraties in het milieu sterk afneemt; daarentegen neemt het ontstaan van endemische soorten toe. Hoge blootstellingsconcentraties resulteren in een snel selectieproces.

Resistentiemechanismen tegen hoge metaal concentraties in het milieu

Aanpassing op cellulair niveau

Hoe kunnen wij mechanismen ontrafelen die het de planten mogelijk gemaakt hebben extreme habitats te begroeien? Van de verschillende mogelijke onderzoeksbenaderingen hebben wij de vergelijking van ecotypen van één plantensoort verder ontwikkelt (Baumeister 1954, Ernst 1974, Schat et al. 1996, Assunção et al. 2001). In onze groep worden ecotypen van een soort, bijv. onze modelsoorten Blaassilene (*Silene vulgaris*) en Zinkboerenkers (*Thlaspi caerulescens*) uit natuurlijke habitats gekozen die met uitzondering van de te onderzoeken factor, bijv. hoog zinkgehalte, gelijk zijn. De Blaassilene heeft specifieke resistenties ontwikkelt tegen een reeks van fysiologisch essentiële zware metalen zoals koper en zink, maar ook tegen niet in de stofwisseling benodigde elementen zoals arseen, cadmium en lood (Ernst 2001) en is één van de weinige plantensoorten met een resistentie tegen zwavel dioxide (Dueck et al. 1986). De vergelijkende ecofysiologie van ecotypen vereist veel ecologische en soortenkennis en is daarmee voor moleculair biologen en plantenfysiologen nauwelijks weggelegd. Daarom wordt deze aanpak wereldwijd slechts mondjesmaat door onderzoeksgroepen overgenomen (Petersen & Philipp 1986, Godzik 1991, Escarré et al. 2000). Van andere benaderingen (Grill et al. 1985, Brewer et al. 1999, Delhaize 1996, Van der Zaal et al. 1999) heeft de vergelijking van soorten uit een geslacht met verschillen in metaalresistentie (Lasat et al. 1996) enig succes geboekt. Door een integratie van het

onderzoek op het niveau van molecuul, cel en individu wil ik de bij metaalresistentie betrokken processen inzichtelijk maken.

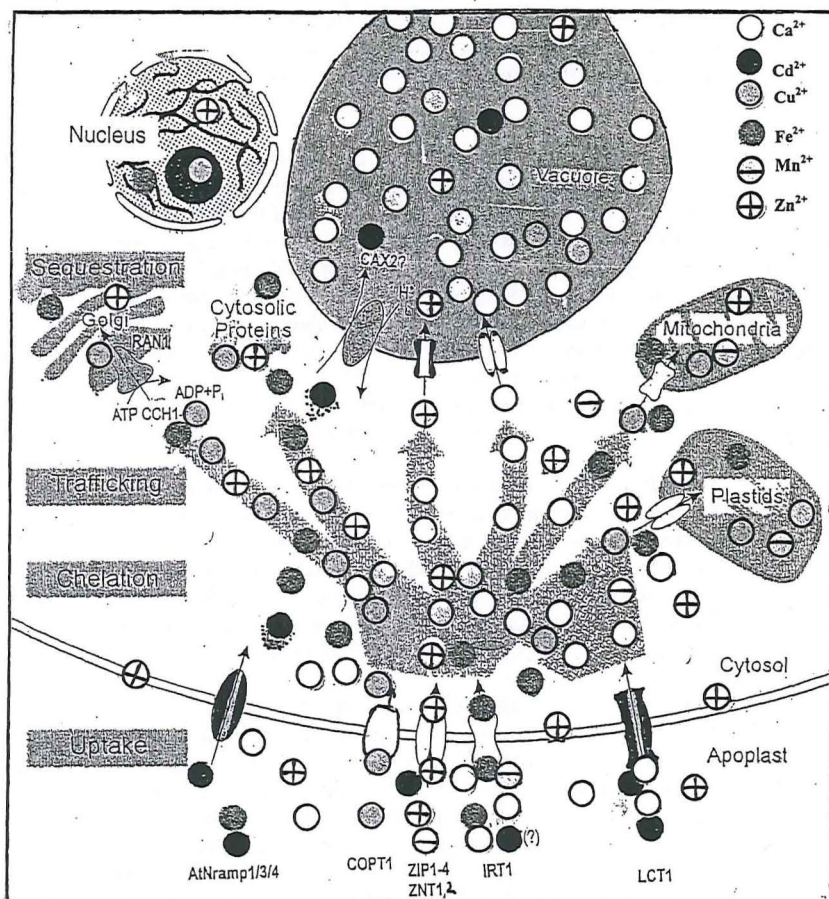
Bij een hogere plant begint de ontwikkeling met de kieming van een zaad. Zodra de kiemwortel de zaadhuid verlaten heeft, worden de wortelcellen onmiddellijk met de chemische samenstelling van het bodemwater geconfronteerd (Ernst 1965). Niet aangepaste planten lopen na enkele uren reeds de eerste schade op (De Vos et al. 1992). Daarom kijken wij eerst naar het verschil in de reacties van wortelcellen van metaalgevoelige en metaalresistente planten op een verhoogde metaal concentratie in het milieu.

In de loop van de evolutie van planten in de biomembranen zijn erg veel, vooral elementspecifieke transporters (Persans et al. 2001) met een hoge of een lage affiniteit tot het betreffende element ontstaan. Bij een laag aanbod in het milieu worden hoge affiniteitstransporters ingeschakeld (Lasat et al. 1996), bij een hoog aanbod worden zij onderdrukt of uitgeschakeld (Meharg & Macnair 1992, Smith et al. 1995, Reid et al. 1996, Pence et al. 2000, Assunção et al. 2001). Deze in de laatste decade pas op moleculair-biologisch niveau ontdekte verschillen in metaalaffiniteit van transporters valt samen met de 40 jaar geleden opgestelde fysiologische twee-fasen theorie van de ionenopname (Epstein et al. 1963), en met de 30 jaar geleden beschreven multifasenopname van macronutriënten (Nissen 1973) die ook voor essentiële zware metalen van toepassing zijn (Marquenie-van der Werff & Ernst 1979).

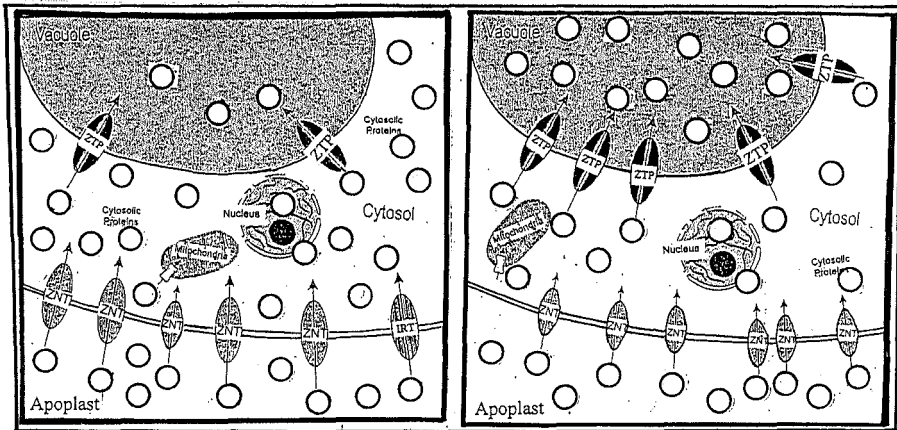
Zodra een metaal het buitenste celmembraan, het plasma membraan, gepasseerd heeft, komt een van de hoofdtaken van de cel aan de orde: het transport naar de plek van de behoefte. In de cel worden hele verkeersnetwerken van metaal transporteiwitten (chaperones) verwacht die door heel specifieke genen gestuurd moeten worden (Valentine & Gralla 1997, Himmelblau et al. 1998). Dit is een complex proces (afb. 5) waarbij een overmaat aan één element kan leiden tot verstoringen in de voorziening van enzymen met een of meer andere elementen.

De andere hoofdtaak in de regulering van de opgenomen metalen bestaat in de verwijdering van overtollige metalen uit het cytosol om negatieve invloeden op de stofwisseling te voorkomen. Daarbij worden door de cel twee wegen bewandeld, óf een dump in de vacuole, de vuilnisemmer van de plantencel, óf een afvoer naar andere cellen en weefsels, omdat de vacuole zoals iedere vuilnisemmer een beperkte opslagcapaciteit heeft. Dit proces van metaal compartimentatie is een fysiologisch concept dat een verhoogd metaaltransport over het tweede biomembraan, de tonoplast, vereist (Chardonnens et al. 1999). Intussen is dit lang geleden beschreven concept (Ernst 1969; Ernst 1975) nu algemeen geaccepteerd voor zink en cadmium (Vögeli-Lange & Wagner 1990, De Knecht 1994, Marschner 1995, Hall 2002). Planten op bodems met een overmaat aan zink en cadmium hebben deze cellulaire compartimentering als een deel van het resistentiemechanisme bijzonder goed tot ontwikkeling gebracht (afb. 6) en danken daaraan hun overleven op metaalrijke bodems. Niet zinkresistente planten kunnen de overtollige zinkionen niet snel genoeg uit het cytosol verwijderen zodat het tot ontregeling van celdeling en celstrekking komt (Davies et al. 1991). Deze ontregeling van de celfysiologie is reeds na een of enkele dagen in verminderde wortelgroei zichtbaar, en heeft geresulteerd

in beproefde methoden voor het vaststellen van de omvang van metaalresistentie binnen en tussen populaties (Jowett 1958, Schat & Ten Bookum 1992).



Afbeelding 5. Hypothetisch schema van genen en metaaltransporters in het plasma membraan en de tonoplast en de intracellulaire verkeerswegen van metalen naar de plaatsen van behoefte (sterk gemodificeerd naar Clemens [2001], en aangevuld met data van Hewitt [1983] en Assunção et al.[2001]).

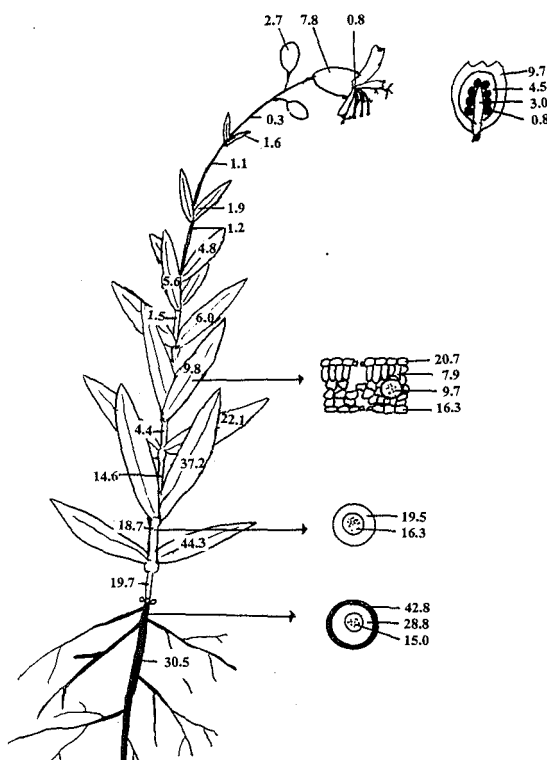


Afbeelding 6. Het verschil in de cellulaire verdeling in een zinkgevoelige plant (links) en een zinkresistente plant (rechts) ligt in de snelheid van de verwijdering van vrije Zn-ionen uit het cytosol en de ophoping in de vacuole.

Aanpassing op individueel niveau

De zware metalen zijn niet alleen aanwezig in de epidermiscellen maar komen in alle cellen van de wortel terecht. Uiteindelijk moeten zij naar de spruit getransporteerd worden om in de behoefte van de spruitcellen te voorzien. Maar hoe kunnen de metaalresistente planten enerzijds in de behoefte van de spruit voorzien en tegelijkertijd de spruit tegen een overmaat beschermen? Bij het transport van zware metalen naar de spruit moeten zij eerst de barrière van de endodermis met de strip van Caspary nemen. De endodermiscellen hebben een lipofiele celwand, die alle in het water opgeloste chemische elementen dwingt hun toegang naar de vaatbundel door het plasma membraan van de endodermis fysiologisch te laten controleren. Daarna worden de metalen in de vaatbundel overgebracht en met de waterstroom naar de spruit vervoerd. Hier moeten de metalen enerzijds weer in de cellulaire behoefte voorzien, maar tegelijkertijd moet voorkomen worden dat metaalgevoelige celorganellen en processen aan een overmaat van metalen blootgesteld worden. Daarom wordt het metaaltransport in metaalresistente planten zo geregeld dat de overmaat aan metalen zich bij voorkeur in cellen zonder chloroplasten ophoopt, zoals in de bladepidermis. Daarmee schept de plant een

"win-win" situatie: de plant raakt het overtollige metaal kwijt en door de hoge metaalconcentratie in de epidermiscellen, dus de buitenkant van de bladeren en de stengel, houdt zij zich plantenetende dieren van het lijf (Ernst 1987). Deze verdedigingsfunctie is erg effectief omdat de evolutie van plantenetende dieren nauwelijks een selectie voor het tolereren van voedsel met een hoog metaalgehalte tot stand gebracht heeft (Boyd & Martens 1994). De differentiatie in de zinkverdeling vindt niet alleen binnen een blad plaats, maar ook tussen bladeren. Bij voorkeur wordt de overmaat aan metalen in oude, fotosynthetisch niet meer zeer actieve bladeren opgehoopt. Hierdoor ontstaat een metaalgradiënt in de spruit bij metaalresistente planten die door metaalgevoelige planten niet geëvenaard kan worden (afb. 7). De bescherming van celorganellen in metaalresistente planten krijgt zijn apotheose bij de aanleg van het zaad. Van alle plantendelen van metaalresistente planten ontvangen zaden de laagste toevoer van metalen.



Afbeelding 7. Verdeling van zink in een zinkresistent ecotyp van de Blaassilene (*Silene vulgaris*). Met uitzondering van het zaad hebben alle plantendelen hoge zinkconcentraties.

Wanneer de overmaat niet meer goed geregeld wordt kan men met het blote oog de storingen van de stofwisseling in de vorm van verkleuringen van de bladeren en

dwerfgroei zien, zoals dat bij metaalgevoelige planten reeds bij veel lagere concentraties optreedt (Ernst 1974). Dus ook metaalresistente planten kunnen niet hoge metaalconcentraties in het milieu willekeurig verwerken.

Zink verandert niet zijn elektronentoestand in het hele fysiologische gebeuren in tegenstelling tot drie andere essentiële zware metalen, t.w. koper, ijzer en mangaan, die in de cel gereduceerd moeten worden om fysiologisch actief te kunnen zijn. Het in het waterige buitenmilieu tweewaardige koper wordt gedurende het transport over het plasma membraan van Cu^{2+} tot Cu^+ gereduceerd. Cu^+ is veel agressiever dan Cu^{2+} ; het tast de biomembranen aan en produceert veel zuurstofradicalen (De Vos et al., 1992). Van de kopergevoelige planten weten wij dat zij door de aanmaak van fytochelatinen de schade van een overmaat aan koper proberen te beperken; toch is hun fysiologische inspanning niet voldoende om op een bodem met verhoogde kopergehalten te overleven. Koperresistente planten regelen de reactiviteit van koper zodanig dat kopergevoelige organellen, zoals de chloroplasten, niet aangetast worden en ook geen verhoogde synthese van zuurstofradicalen afvangende enzymen plaats vindt (Lolkema & Vooijs 1986). Zeker is dat de verminderde koperopname - misschien door een verlaging van de activiteit of de hoeveelheid van de hoge Cu-affiniteitstransporter - niet de enige component is in het resistentiemechanisme tegen koper. Hoe koperresistente planten het koper in het cytosol wel ontgiften is onvoldoende bekend (Van Hoof et al. 2001).

Van de fysiologisch niet benodigde zware metalen heeft arsenaat geen eigen transporters in het plasma membraan, maar laat zich door de fosfaattransporters de plantencel binnenbrengen. Door de uitschakeling van de hoge-affiniteit fosfaattransporter wordt de arseenopname in arsenaatresistente planten verlaagd (Meharg & Macnair 1992) en door binding aan fytochelatinen beter in het cytosol ontgiftigd (Hartley-Whitaker et al. 2001) dan bij arsenaat-sensitieve planten (Sneller et al. 1999). Het is nog omstreken via welke transporter(s) cadmium in de cel opgenomen wordt en hoe groot de betekenis is van fytochelatinen in de cadmiumresistentie van Blaassilene (Verkleij & Prast 1989, De Knecht et al. 1995) en van andere plantensoorten (Vögeli-Lange & Wagner 1989).

Plant - dier interacties in metaalrijke ecosystemen

Het fysiologisch voordeel van de bescherming van het zaad tegen een hoge accumulatie van metalen op metaalrijke bodems heeft helaas ook een ecologisch nadeel. Het schept in een metaalrijke omgeving een metaalarme niche (Ernst 1987). Enkele insecten hebben deze metaalarme niches in metaalrijke vegetaties ontdekt en leven daar conform het motto "Wie niet sterk is moet slim zijn". Een van deze insecten is het Anjeruiltje (*Hadena* spp.) dat zich op Blaassilene gespecialiseerd heeft. Het nachtvlindertje bestuift eerst de bloemen van de Blaassilene en legt aansluitend een ei in de bestoven bloem. De hieruit ontstane rups voedt zich met de ontwikkelde zaden en verhindert daarmee zaadzetting. Geparasiteerde planten houden weinig zaad over voor de volgende generatie, maar door de lange levensduur van de Blaassilene en vele andere metaalresistente plantensoorten - meer dan 50 jaar - blijft toch nog voldoende zaad van niet-geparasiteerde bloemen over om het voortbestaan van de populatie te waarborgen. Populaties van Blaassilene op koperrijke bodems

hebben de "slimheid" van de Anjeruiltjes met een verkleining van de zaaddoos beantwoord, zodat de rups over de hele levenscyclus niet voldoende voedsel kan vinden en bij het verhuizen van een zaaddoos naar een andere, door bijv. vogels geconsumeerd kan worden (Ernst 1987). Het 24-stippig lieveheersbeestje (*Subcoccinella 24-punctata*) kiest op zinkrijke bodems de jongste bladeren en bloemknoppen, die eveneens een laag metaalgehalte in de vroege zomer hebben, om hier zijn levenscyclus van ei tot kever te voltooien.

Andere levensbeperkende factoren op metaalrijke bodems

Ofschoon het onderzoek naar de overleving van planten aan de grenzen van leven zich meestal op een extreme milieucomponent concentreert, eisen extreme habitats aanpassingen van een plant aan meer dan één component. Schimper, de nestor van de ecofysiologie van planten, heeft meer dan 100 jaar geleden in zijn boek "Pflanzen-Geographie auf physiologischer Grundlage" (Schimper 1898) deze bredere blik op de plant-habitat-relatie zo verwoord: "Die Wechselwirkung der Pflanze innewohnenden Veränderlichkeit mit der Veränderlichkeit der äusseren Factoren bedingt eine bald schneller, bald langsamer, jedoch fortwährend sich vollziehende Umformung". Daarmee zegt hij dat het noodzakelijk is alle factoren op een plaats in het onderzoek te betrekken om te begrijpen waarom een grens in de evolutie tot nu toe niet overschreden kon worden.

Tabel 1. Aanpassingen van planten aan een metaalrijke bodem

Abiotische milieucomponent	Aanpassing van de plant
Hoge metaalconcentratie	Specifieke resistentie tegen ieder metaal in overmaat Lokalisatie van metalen in de epidermis ter afweer van herbivoren
Geringe beschikbaarheid van N en P	Selectie voor efficiënt hergebruik
Geringe beschikbaarheid van water	Vermindering van het bladoppervlak Structurele verhoging van osmotica en vrij-water conserverende stoffen
Expositie aan hoge UV-B straling	Verhoogde synthese van flavonoiden
Mobiliteit van de bodem	Aanleg van veel rustende bijknoppen aan de wortelhals Snelle groei van overdekte plantendelen

Op veel metaalrijke bodems moeten planten niet alleen met de overmaat aan zware metalen uitkomen, maar zich ook aanpassen aan tekorten van andere nutriënten zoals stikstof en fosfaat, aan de lage voorziening van water en aan de mobiliteit van de bodem (Tabel 1). Het terugtransport van schaarse nutriënten uit oude, niet meer volledig functionele plantenorganen en het overbrengen naar de jonge delen staat aan de basis van de selectie voor nutriëntenefficiëntie, die nagenoeg alle planten van extreme standplaatsen kenmerkt. Een structureel tekort aan water wordt door

vermindering van het waterverdampende oppervlak van de bladeren (Schwanitz & Hahn 1954) en/of door de ophoping van osmotisch actieve stoffen (Schat et al. 1997) beheerst. Van planten op zo een metaalrijke bodem wordt nog meer vereist. Ertsaders komen veelal voor op hellingen aan het aardoppervlak. De lage begroeiing kan een beweging van het substraat door regen en wind niet voldoende tegengaan. Daarom moet een plantensoort op zo'n helling de mechanische beschadiging kunnen repareren, veelal vanuit rustende zijknoppen aan de wortelhals. Met dit voorbeeld heb ik willen laten zien hoe moeilijk de ontrafeling is van alle aanpassingen, die planten moeten ondergaan om in een extreme habitat te kunnen groeien.

Al deze beperkingen resulteren in een lage productiviteit van planten op metaalrijke bodems. Door de permanente nalevering van metalen uit de verwerende ertsaderen blijven pionierstadia van metaalvegetaties over duizenden jaren stabiel. Alleen uit de vegetatiezonering op metaalrijke bodems kunnen verwachtingen over het verloop van de vegetatiesuccessie afgeleid worden (Ernst 1974).

Samenvattend wil ik stellen dat het onderzoek naar metaalresistentie van planten in de afgelopen 40 jaar veel vooruitgang geboekt heeft. Toch blijft nog veel werk te verrichten om de signalen voor metaalverzadiging en de regulatie van metaalbehoefte te ontdekken. Met de analyse van het doelmatige transport van koper m.b.v. transporteiwitten (chaperones) van het plasma membraan naar de subcellulaire plaatsen door Valentine en Gralla (1997) is een eerste aanzet gegeven om cellulaire prioriteiten en posterioriteiten voor metaaltransport in cellulaire verzorgingslijnen te begrijpen. Deze celprocessen zijn voor alle organismen van fundamentele betekenis. Planten met een hoge verscheidenheid in metaalbehoefte kunnen helpen bij de opheldering hiervan.

Onze groep heeft het voordeel ecologische kennis van plantensoorten te kunnen combineren met fysiologische en moleculair biologische benaderingen. Ik wens medewerkers en promovendi van de afdeling Ecologie en Fysiologie van Planten veel succes en vindingrijkheid om de leidende positie op het gebied van metaalresistentie-mechanismen zeker te stellen en verder uit te bouwen.

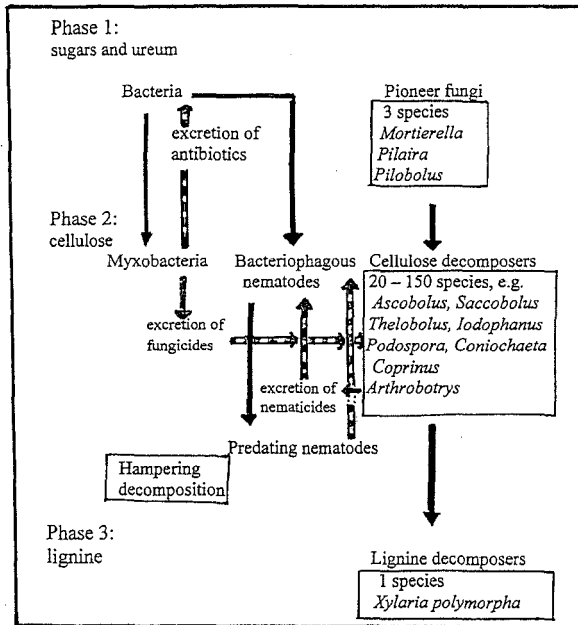
Levensgrenzen op een organisch substraat

Zoals in de inleiding genoemd, kunnen extreme habitats ook kleiner dan 1 cm^3 zijn en bestaan uit substraten die door hun chemische samenstelling moeilijk te begroeien zijn. Een voorbeeld hiervan zijn "konijnenkeutels" waarop een in de natuur moeizaam verlopend en 4 tot 6 jaar durend decompositieproces optreedt. Na hun introductie in het practicum "Bodembiologie" tien jaar geleden en later in de cursus "Levensgemeenschapsecologie" zijn zij erg geschikte onderwerpen gebleken om studenten binnen vier weken de basale processen van successie, decompositie en biologische competitie te laten bestuderen.

Hoe verlopen deze processen? Toevoeging van water kan binnen een dag een uitgedroogde konijnenkeutel veranderen in een substraat met hoge biodiversiteit en met een successie die door verandering van de chemische samenstelling van het

substraat door de organismen zelf gestuurd wordt (Afb. 8). Reeds twee dagen na bevochtiging beginnen pionierschimmels sporangioforen te ontwikkelen zoals *Pilaira anomala* en *Pilobolus crystallinus* (Zygomyceten) die in korte tijd samen met bacteriën en protozoën alle beschikbare suikers en ureum verbruiken. Hierna worden veel organismen van de tweede successiefase zichtbaar met vooral cellulase afbrekende schimmels behorend tot de ascomyceten en basidiomyceten, die in aanwezigheid van ureum en ammonium hun decompositierol niet kunnen vervullen. De toenemende soortendiversiteit stimuleert ook de competitie, niet alleen onder schimmels. Nadat aan het zuurstofrijke oppervlak van de keutel minder cellulose beschikbaar is, begint met het verschijnen van de Konijnenkeutelgeweizwam (*Xylaria polymorpha*) de derde successiefase waarin het zeer moeilijk afbreekbare lignine als substraat dient. Een konijnenkeutel is ook een aantrekkelijk substraat voor het bestuderen van biologische bestrijding. Sommige schimmelsoorten van de tweede successiefase hebben zich erop gespecialiseerd om bacteriënetende aaltjes te vangen om aan extra eiwitten te komen: de aaltjes worden met een touwachtige lus gewurgd (Barron 1992), of door uitscheiding van een nematocide gedood en aansluitend leeg gezogen (Anke et al. 1994).

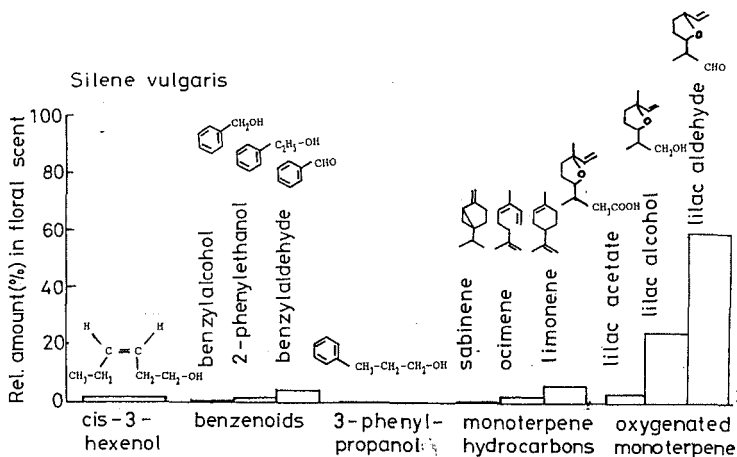
Andere organismen gedragen zich nog agressiever dan de aaltjesvangende schimmels. Zodra zich op een keutel een groep van Myxobacteriën ontwikkeld heeft, is het met de biodiversiteit van schimmels, aaltjes, protozoën en raderdiertjes afgelopen. Deze myxobacteriën verteren eerst de andere aanwezige bacteriën en beschermen zich door het uitscheiden van tot nu toe nauwelijks bekende antibiotica, die in het buitenland enorme aandacht van biotechnologen trekken (Reichenbach 2001). De werkzaamheid van deze antibiotica is zo groot dat zij nieuwe grenzen voor het leven op konijnenkeutels scheppen en alle afbraakprocessen stopzetten. De belemmering van afbraakprocessen in de strooisellaag van konijnenlatrines kan ook op deze pas ontdekte bio-actieve stoffen terug te voeren zijn.



Afbeelding 8. De successie van organismen op een konijnenkeutel na toevoeging van water en de wederzijdse beïnvloeding door vermindering van gemakkelijk verwerkbare substraten en door uitscheiding van stoffen die de vitaliteit van populaties verlagen of het leven van organismen beëindigen en het afbraakproces enorm vertragen.

Leven van biologen aan de grens van de kennis van het leven

Nu ik aan het eind van dit college gekomen ben, wil ik nog enkele andere aspecten kort belichten die bij het bestuderen van leven een rol kunnen spelen. Observeren van biologische verschijnselen en processen is een vereiste om de biologie van een organisme, een levensgemeenschap of een ecosysteem te begrijpen en in de juiste context te kunnen plaatsen. Helaas krijgt dit basisprincipe van de levenswetenschap op het VWO en op de universiteit niet (meer) voldoende aandacht. Uiteraard is overdracht van kennis een noodzakelijke taak in het universitaire onderwijs (het enige aspect in de evaluatie door het OAB); het andere deel is de integratie van deze kennis en het kunnen destilleren van principes op een hoger integratieniveau, het zogenaamde academisch denken. Deze integratie van biologische processen heb ik geprobeerd ook uit te dragen op excursies. Iedereen die met mij op excursie gaat weet dat ik veel waarde hecht aan het gebruik maken van alle zintuigen: De ogen zijn heel belangrijk voor het observeren, maar deze zijn bij veel biologen slecht getraind. Bij het ruiken van de ons in de natuur omgevende lucht kan men een grote diversiteit aan door planten uitgescheiden organische componenten waarnemen zoals mono- en sesquiterpenen, alkaloiden en aromaten. De verschillende bestanddelen van de bloemgeur zoals bijv. van de Blaassilene (Afb. 9) spelen een selectieve rol bij het aantrekken van bestuivende dieren, maar verhogen ook het levensgevoel van de mens. Helaas zijn de meeste mensen, inclusief biologie-studenten, niet geoefend om zulke geuren waar te nemen en te identificeren; een groot gemis in het leven.



Afbeelding 9. Dominante geurcomponenten die van de bloemen van de Blaassilene in de omgeving geëmitteerd worden (Data van Knudsen & Tollsten 1993).

Het betasten van de structuur van een boomschors of de beharing van bladeren kunnen inzichten in de biologie verruimen, maar blijkbaar hebben aankomende studenten op het VWO alleen geleerd de ligging van computertoetsen waar te nemen. Het horen is nog minder ontwikkeld dan ruiken en voelen. Toch ben ik nog steeds verbaasd hoe moeilijk het voor excursiedeelnemers is een met tientallen decibellen zingende (blèrende) winterkoning waar te nemen en te lokaliseren. Het is te betreuren dat veel mensen, niet alleen biologen de wonderre wereld van de geluiden van zoogdieren, vogels, kikkers, cicaden, krekels en sprinkhanen verborgen blijft.

Veelal wordt de vraag gesteld of studenten vandaag minder goed zijn dan vroeger, bijv. 40 jaar geleden: mijn antwoord is genuanceerd. Ter vergelijking met studenten uit de jaren 1960 en 1970 zijn studenten in het laatste decennium minder nieuwsgierig en zelf zoekend in het veld bezig, maar wachten op de toelichting door de docent, d.w.z. meer consumptie dan ontdekking van wetenschap. Ook in mijn studententijd waren weinig biologiestudenten te bekennen die een grote soortenkennis konden tonen en in staat waren biologische processen in een groter kader te plaatsen. Alleen het aantal reeds aan het begin van de studie hoog gemotiveerde studenten was destijds groter dan vandaag en deze studenten waren en zijn ook nu meestal afkomstig van scholen met een uitstekende biologiedocent(e) - zoals mijn biologiedocent Dr. G. Knoblauch, Goethe Gymnasium te Ibbenbüren - en/of uit de Jeugdbond voor Natuurstudie. Ik hoop dat de nu ingezette nieuwe trend voor de interesse in veldbiologie zodanig grenzen in de biologie verlegt, dat soortenkennis geïntegreerd wordt met kennis in de biologie van cel, organisme, populatie en levensgemeenschap. Het kost meer inspanning, maar pas met deze kennis van het leven is een mens een bioloog.

Slotopmerkingen en dank

Om ecologie en ecofysiologie, maar ook in het algemeen de biologie adequaat te kunnen beoefenen, is de waarneming van organismen in het veld een vereiste voor een biologisch relevante hypothese ontwikkeling en de verificatie van resultaten behaald in laboratoriumexperimenten. Daarom wil ik ook namens mijn studenten, promovendi en medewerkers mijn dank betuigen aan beheerders van natuurgebieden in Nederland, met name het Provinciaal Waterleidingbedrijf van Noord-Holland, Gemeentewaterleidingen van Amsterdam, het Amsterdamse Bos, Natuurmonumenten en Staatsbosbeheer voor de gelegenheid en vooral de gastvrijheid om met relatief weinig beperkingen onderzoek en onderwijs in hun gebieden te mogen uitvoeren. Daarentegen zijn de arbeidsomstandigheden op de A-vleugel van het W & N gebouw op de Campus van de VU in de laatste jaren helaas minder stimulerend geweest voor onderzoek en onderwijs door hoge geluids- en stofoverlast, door mechanische hinder en vernietiging van moeizaam in het veld verzamelde, in klimaatkamers duur opgekweekte en geselecteerde eco- en genotypen van planten.

Mijnheer de rector magnificus, dames en heren,

In de afgelopen decennia heb ik met velen binnen en buiten de eigen afdeling van de voormalige Faculteit der Biologie en binnen de voormalige β -faculteiten van deze universiteit, met wetenschappers in Nederland, Europa, Afrika en Noord-Amerika

met succes kunnen samenwerken, doceren en publiceren waarvoor ik heel dankbaar ben. In dit kort tijdsbestek kan ik onmogelijk iedereen persoonlijk noemen. In het bijzonder dank ik mijn naaste medewerkers, meer dan 50 (oud)promovendi en studenten voor hun grote inspanning en voortreffelijke ondersteuning. Met veel waardering en dank heb ik gebruik gemaakt van de voorzieningen voor onderwijs en onderzoek en van de speciale onderzoekprogramma's die door het College van Bestuur en de Vereniging voor Christelijk Wetenschappelijk Onderwijs van de Vrije Universiteit beschikbaar zijn gesteld. Tezamen met de additionele financiële steun van nationale en internationale instellingen, organisaties en bedrijven heeft dit de basis gelegd voor ons onderzoek aan planten van het moleculaire tot het ecosysteem niveau. Naast het onderzoek en onderwijs in Nederland en Europa heb ik veel mogelijkheden voor onderzoek van Afrikaanse ecosystemen gehad waar alleen conflicten tussen naties aan het onderzoek grenzen gesteld hebben. Bij al deze activiteiten heb ik misschien aan mijn familie minder tijd besteed. Mijn vrouw en onze twee zonen hebben veel geduld en begrip voor mijn wetenschappelijke passies opgebracht. Hiervoor mijn hartelijke dank.

Hooggeleerde collega Bartels, met de keuze van de verrijzenisplanten als modelorganismen voor de aanpassingen van planten aan extreem lange uitdrogingsperioden wordt aan de onderzoekstraditie van de afdeling Ecologie en Fysiologie van Planten naar de adaptatie van planten aan extreme levensomstandigheden een nieuw aspect toegevoegd. Ik wens u en uw medewerkers, promovendi en studenten veel succes bij deze uitdaging en een stof- en geluidshinder arme toekomst.

Dames en heren, ik dank u voor uw aanwezigheid en uw belangstelling. Het ga u allen goed.

Ik heb gezegd.

Selecte referenties

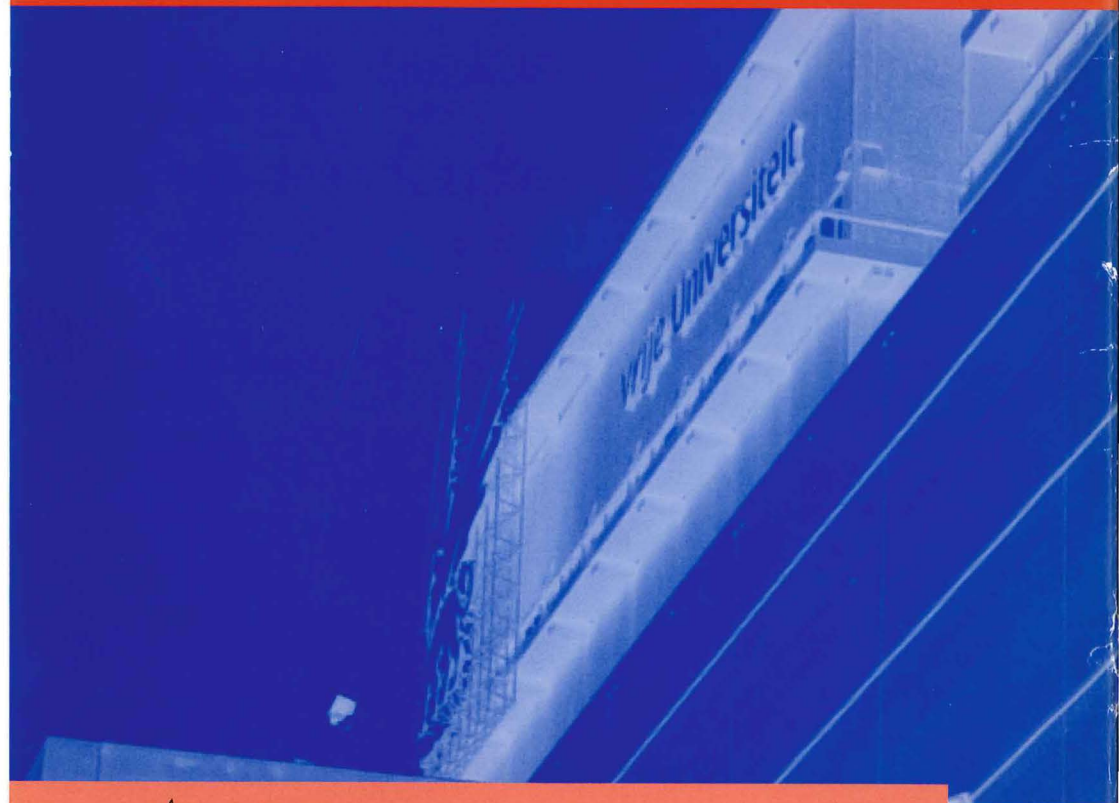
Om de lengte van de lijst van referenties te beperken zijn hier alleen enkele publicaties genoemd die de ontwikkeling van het onderwerp documenteren. De volledige lijst kan opgevraagd worden via e-mail naar <hoonhout@bio.vu.nl>.

- Assunção, A.G.L., Da Costa Martins, P., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M.G.M., 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* 24, 217-226.
- Baumeister, W., 1954. Über der Einfluss des Zinks bei *Silene inflata* Smith. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 67, 205-213.
- Boyd, R.S., Martens, S.N., 1994. Nickel hyperaccumulated by *Thlaspi montanum* var. *montanum* is acutely toxic to an insect herbivore. *Oikos* 70, 21-25.
- Bradshaw, A.D., 1952. Populations of *Agrostis tenuis* resistant to lead and zinc poisoning. *Nature* 169, 1098.
- Chardonens, A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* 120, 779-785.
- Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475-486.
- De Knecht, J., Van Baren, N., Ten Bookum, W.M., Wong Fong Sang, H.W., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1995. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Sci.* 106, 9-18.
- De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs, R., Schat, H., 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* 98, 853-858.
- Dueck, Th. A., Ernst, W.H.O., Mooi, J., Pasman, F.J.M., 1986. Effects of SO₂, NO_x and O₃ in combination on the yield and reproduction of *Silene cucubalus* populations. *J. Plant Physiol.* 122, 97-106.
- Duvigneaud, P., 1959. Plantes <cobaltophytes> dans le Haut-Katanga. *Bull. Soc. R. Bot. Belg.* 91, 111-134.
- Epstein, E., Rains, D.W., Elzam, O.E., 1963. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 684-692.
- Ernst, W., 1965. Über den Einfluss des Zinks auf die Keimung von Schwermetallpflanzen und auf die Entwicklung der Schwermetall-Pflanzengesellschaft. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 78, 205-212.
- Ernst, W., 1968. Der Einfluss der Phosphatversorgung sowie die Wirkung von ionogenem und chelatisiertem Zink auf die Zink- und Phosphataufnahme einiger Schwermetallpflanzen. *Physiol. Plant.* 21, 323-333.
- Ernst, W., 1969. Zur Physiologie der Schwermetallpflanzen - Subzelluläre Speicherungsorte des Zinks -. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 82, 161-164.
- Ernst, W., 1974. Schwermetallvegetation der Erde. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Ernst, W.H.O., 1987. Population differentiation in grassland vegetation. In: Van Andel, J., Bakker, J.P., Snaydon, R.W. (eds.), *Disturbance in Grasslands*. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 213 - 228.
- Ernst, W.H.O., 1999. Evolution of plants on soils anthropogenically contaminated by heavy metals. In: Van Raamsdonk, L.W.D., Den Nijs, J.C.M. (eds.), *Plant Evolution in Man-Made Habitats*. VIIth International Symposium of the Organization of Plant Biosystematics, Amsterdam 1998. University of Amsterdam, pp. 13-27.

- Ernst, W.H.O., 2001. Evolutive Anpassungsmechanismen an Schwermetallböden. In: Larcher, W., Ökophysiologie der Pflanzen. 6th edition. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, pp. 353-355.
- Ernst, W.H.O., Nelissen, H.J.M., Ten Bookum, W.M., 2000. Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environ. Exp. Bot.* 43, 55-71.
- Escarre, J., Lefebvre, Gruber, W., Leblanc, M., Lepart, J., Rivière, Y., Delay, B., 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: Implications for phytoremediation. *New Phytol.* 145, 429-437.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten Bookum, W.M., Schat, H., Meharg, A.A., 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol.* 126, 299-306.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L., 1993. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: Floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Bot. J. Linn. Soc.* 113, 263-284.
- Lolkema, P.C., Vooijs, R., 1986. Copper tolerance in *Silene cucubalus*. Subcellular distribution of copper and its effects on chloroplasts and plastocyanin synthesis. *Planta* 167, 30-36.
- Marquenie-Van der Werff, M., Ernst, W.H.O., 1979. Kinetics of copper and zinc uptake by leaves and roots of an aquatic plant, *Elodea nuttallii*. *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 1-10.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R., 1992. Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J. Exp. Bot.* 43, 519-524.
- Nissen, P., 1973. Multiphasic uptake in plants. I. Phosphate and sulfate. *Physiol. Plant.* 28, 304-316.
- Ramanjulu, S., Bartels, D., 2002. Drought and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* 25, 141-151.
- Reichenbach, H., 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Industr. Microbiol. Biotech.* 27, 149-156.
- Rozema, J., Van de Staaij, J., Björn, L.O., Caldwell, M., 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol. Evol.* 12, 22-28.
- Schat, H., Vooijs, R., Kuiper, E., 1996. Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution* 50, 1888-1895.
- Sneller, F.E.C., Van Heerwaarden, L.M., Kraaijeveld-Smit, F.J.L., Ten Bookum, W.M., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1999. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris* accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phytol.* 144, 223-232.
- Swennen, R., Van Keer, I., De Vos, W., 1994. Heavy metal contamination in overbank sediments of the Geul river (East Belgium): its relation to former Pb-Zn mining activities. *Environ. Geol.* 24, 12-21.
- Valentine, J., Gralla, E.B., 1997. Delivering copper inside yeast and human cells. *Science* 278, 817-818.
- Van Hoof, N.A.L.M., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W.J., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Karenlampi, S.O., Tervahauta, A.L., 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol.* 126, 1519 - 1526.
- Van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Hooykaas, P.J.J., 1999. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* 119, 1047-1055.
- Verkleij, J.A.C., Prast, J.E., 1989. Cadmium tolerance and co-tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke [= *S. cucubalus* (L.) Wib.]. *New Phytol.* 111, 637-645.

- Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., 1991. Milieugevaarlijke stoffen en de effecten op hogere planten. In: Hekstra, G.P., Van Linden, F.J.M. (red.), Flora an fauna chemisch onder druk. Pudoc, Wageningen, pp. 81-102.
- Wild, H., 1968. Geobotanical anomalies in Rhodesia. 1. The vegetation of copper bearing soils. *Kirkia* 7, 1-83.

onderzoeken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren
geven veronderstellen bevestigen luisteren verwonderen waarnemen verwijzen vergelijken verbinden
en doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren
oeken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren verwonderen waarnemen verwijzen vergelijken verbinden
oeken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren v
zoeken doorgeven veronderstellen bevestige
oeken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren verwonderen waarnemen verwijzen vergelijken verbinden
derzoeken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren
wonderen waarnemen verwijzen vergelijken verbinden toetsen onderzoeken doorgeven veronderstel



VU Boekhandel/Uitgeverij Amsterdam
ISBN 90 - 5383 - 817 - 1